

李国玲, 徐志谦, 杨化强, 等. 转基因和基因编辑猪的研究进展 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(5): 91-101.
LI Guoling, XU Zhiqian, YANG Huaqiang, et al. Advances on transgenic and gene-edited pigs[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(5): 91-101.

转基因和基因编辑猪的研究进展

李国玲, 徐志谦, 杨化强, 吴珍芳

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 猪是重要的农业经济动物, 其在遗传背景、解剖学、生理病理学、营养代谢和疾病特征等方面与人类高度相似, 是农业生产性状改良、人类疾病动物模型和异种器官移植研究的重要对象。随着 ZFN、TALEN 和 CRISPR 等基因编辑技术的出现, 转基因或基因编辑猪的研究取得快速发展。本文将结合当前我国转基因及基因编辑猪的研究现状, 对基因编辑技术在农业生产性状改良如提高产肉量、改善肉质、提高抗病能力和建立人类疾病模型、动物生物反应器、异种器官移植等方面进行综述, 以期对猪遗传改良和医学研究提供参考。

关键词: 转基因猪; 基因编辑猪; 遗传改良; 疾病模型; 生物反应器; 异种器官移植
中图分类号: S828 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2019)05-0091-11

Advances on transgenic and gene-edited pigs

LI Guoling, XU Zhiqian, YANG Huaqiang, WU Zhenfang

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Pigs are important agricultural animals and highly similar to humans in terms of genetic background, anatomy, physiological pathology, nutrient metabolism and disease characteristics. Pigs are intensively studied for the improvement of production traits, establishment of animal models for human diseases and xenotransplantation. With the emergence of gene editing technologies, such as ZFN, TALEN and CRISPR, the research on transgenic or gene-edited pigs has achieved a rapid development. This review summarizes the current research advance of transgenic and gene-edited pigs in China. We also review the applications of gene editing technology in agricultural area, such as increasing meat production, improving meat quality, and resisting disease, as well as in biomedical study such as establishing human disease models, animal bioreactors and xenotransplantation for references of pig genetic improvement and medical research.

Key words: transgenic pig; gene-edited pig; genetic improvement; disease model; bioreactor; xenotransplantation

猪作为重要的农业经济动物是人类肉类产品的主要来源, 同时猪在遗传背景、解剖学、生理病理学、营养代谢和疾病特征等方面与人类高度相似, 因此也成为生物医学研究中的重要模式生物^[1-3]。转基因和基因编辑猪的研究对猪农业生产性状的改良和特定性状的培育, 以及人类疾病发生机制、病理毒理研究、治疗药物评估等方面具有重要的应用价值。随着锌指核酸酶 (Zinc finger nucleases, ZFN)、类转录启动因子效应物核酸酶 (Transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 和规律性重复短回文序列簇 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas endonucleases 9,

理毒理研究、治疗药物评估等方面具有重要的应用价值。随着锌指核酸酶 (Zinc finger nucleases, ZFN)、类转录启动因子效应物核酸酶 (Transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 和规律性重复短回文序列簇 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas endonucleases 9,

CRISPR/Cas9) 等基因编辑技术的出现^[4-8], 其突破了传统分子标记辅助选择和数量性状位点等的技术障碍, 实现了基因组的精确修饰, 大幅提高和改良了猪生产性状; 同时也在动物生物反应器、人类疾病模型、异种器官移植等生物医学领域的发展发挥了重要作用。本文将结合当前我国转基因及基因编辑猪的研究现状, 对其在农业生产性状改良如提高产肉量、改善肉质、提高抗病能力和建立动物生物反应器, 模拟人类疾病, 应用于异种器官移植等方面进行综述。

1 我国转基因和基因编辑猪的研究现状

本文利用中国知网 (CNKI)、Web of Science、国家知识产权局三大平台, 采用“转基因”、“基因编辑”、“猪”等相关转基因技术和基因编辑技术猪制备等一系列专有名词, 对“十一五”之后国内外的转基因猪的文献和专利进行检索。在 CNKI 数据库中, 截止至 2019 年 3 月, 共有 166 篇关于转基因或基因编辑猪制备及其表型分析、应用的中文研究性论文发表, 其中“十一五”期间 25 篇、“十二五”期间 76 篇、“十三五”期间 68 篇。研究机构分布以吉林大学、中国农业大学、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所和湖北省农业科学院畜牧兽医研究所最为突出。在 Web of Science 数据库中, 共检索到 332 篇关于转基因猪制备、表型分析及应用的英文论文, 其中中国 131 篇、美国 95 篇、德国、日本和韩国均为 34 篇; 在中国转基因或基因编辑猪相关英文论文中, “十一五”发表 8 篇 (占全球相关文献 17.78%)、“十二五”发表 52 篇 (占全球相关文献 37.68%)、“十三五”发表 71 篇 (占全球相关文献 47.65%), 单位以中国农业大学、中国农业科学院和中国科学院贡献最大。在国家知识产权局数据库中, 共检索到 281 项国内外转基因或基因编辑猪制备的专利, 其中在美国申请的专利 99 项、在中国申请的专利 67 项, 在韩国申请的专利 46 项。在中国申请的专利中, “十一五”期间有 14 项 (占全球相关专利 12.28%)、“十二五”期间有 27 项 (占全球相关专利 23.47%)、“十三五”期间有 26 项 (占全球相关专利 45.61%), 其中申请单位以中国农业大学、吉林大学、华南农业大学、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所最多。随着转基因生物新品种培育重大专项实施, 我国的转基因或基因编辑猪的研究得以快速发展, 研究成果在数量上已经超过美国, 但大部分专利或论文都是同一表型不同技术不同品种的制备, 原创性还有待提高^[9]。整体

而言, 我国的转基因或基因编辑猪研发能力处于世界前列, 其中节粮环保型转基因猪、耐寒抗病猪、人类疾病模型等均处于世界领先地位。

2 基因编辑技术的概述

传统的基因操作技术是将目的基因随机插入到基因组内, 这种随机整合的方式会对后期基因编辑动物或人类疾病模型的研究带来较大困难。近年来, ZFN、TALEN 和 CRISPR 系统等基因编辑工具的发现和应用^[4-8], 使动物基因组定点修饰获得了突破性的进展。ZFN 技术是最早被广泛使用的基因编辑技术, 其由特异的 DNA 识别域和非特异性限制性核酸内切酶 (*Fok I*) 组成, DNA 识别域由 3~4 个串联的可识别特异碱基三联体的锌指蛋白构成, *Fok I* 二聚化后能切割基因组^[10-13]。TALEN 的原理与 ZFN 相似, 但 DNA 识别模块是由 14~18 个识别靶点序列的 TAL 单元串联组成^[14-17], 而 CRISPR/Cas9 技术摆脱了合成和组装具有特异性 DNA 识别能力蛋白模块的繁琐操作, 由一条外源单链向导 RNA (sgRNA) 和 Cas9 蛋白组成, sgRNA 通过碱基互补配对原则识别基因组序列, 并引导 Cas9 蛋白切割基因组^[4-8]。随后研究人员开发了一系列突变体 Cas9 系统, 如 VRER SpCas9^[18]、VQR SpCas9^[18]、XCas9 3.7 (TLIKDIV SpCas9)^[19] 等, 以及分子量更小、效率相当或更高的基因编辑工具, 如 SGN^[20]、AsCpf1^[21]、CjCas9^[22]、SaCas9^[23]、Cas14^[24] 等。这些系统本质上是在基因组 DNA 靶位点发生双链断裂 (Double strand break, DSB), 激活体内非同源末端连接 (Nonhomologous end joining, NHEJ) 或同源定向修复 (Homologous-directed repair, HDR) 2 种不同的修复机制^[4, 6, 25-26], 实现内源基因的敲除或外源基因的定点插入。近年来, 该技术已成功应用到细菌、酵母、人类、果蝇、斑马鱼、小鼠、大鼠、家畜等多种生物, 显示了其强大的基因编辑优势^[1-2, 10, 27-28]。基因编辑技术与体细胞克隆技术结合, 可制备出具有重要经济价值或医学研究价值的基因编辑动物, 在动物遗传育种和人类疾病研究等领域具有广阔的前景。

3 转基因和基因编辑猪在农业领域中的应用

猪传统育种手段, 如纯系选育和配套杂交等, 培育理想经济性状所需要的周期较长, 耗费大量的人力与物力, 同时改良的程度受限于品种本身特性和基因型的影响, 无法突破种源的限制引入新性状, 极大程度地影响了猪遗传改良的发展。而转基

因与基因编辑技术的应用, 很好地弥补了传统育种的不足, 为快速改良或提高猪生长发育、肉质质量、抗病能力等农业性状提供了良好的解决措施。

3.1 提高产肉量

猪肉作为我国主要的肉类食品来源, 提高猪的产肉量和瘦肉率是当前猪育种工作的重要目标。胰岛素样生长因子 2 (Insulin-like growth factor 2, IGF2) 是影响骨骼肌发育及脂肪沉积的重要影响因子^[29-30]。1999 年, Jeon 等^[30]发现 IGF2 第 3 个内含子存在 3 处核苷酸突变, 显著增加 IGF2 在肌肉组织中表达量有利于猪瘦肉率的提高。直到 2018 年, Xiang 等^[31]利用 CRISPR/Cas9 技术成功获得了 IGF2 基因第 3 个内含子一个保守的 SNP 位点编辑的巴马猪。与野生型巴马猪相比, IGF2 基因编辑猪显著提高了产肉量和瘦肉率。同样, Liu 等^[32]通过 CRISPR/Cas9 技术获得双等位基因缺失 IGF2 基因编辑猪, 证明 IGF2 内含子 3 的突变对肌生成有着重要影响, 为培育具有较高瘦肉率的两广小耳猪提供了依据。继胰岛素样生长因子之后, Myostatin (MSTN) 基因是被发现的又一新功能基因。MSTN 基因是目前为止发现唯一对肌肉生长起负调控作用, 控制猪个体生长发育和脂肪沉积, 改善猪产肉性能的有效基因, 其突变可导致肌肉异常增长或产生双肌臀表型。2015 年, Qian 等^[33]利用 ZFN 技术成功获得 MSTN 突变的基因编辑梅山猪, 目前已经繁育第 5 代, 双等位突变基因编辑猪育种群瘦肉率显著提高。随后吴添文等^[9]利用 TALEN 技术编辑 MSTN 基因成功制备梅山猪和大白猪, 目前已获准开展转基因生物安全评价的中间试验。此外, Wang 等^[34]利用 CRISPR/Cas9 技术对猪胎儿成纤维细胞 MSTN 基因进行定点编辑, 通过核移植技术成功制备 MSTN 基因纯合子敲除猪, 该猪肌纤维数目显著增加并表现出特定的“双肌臀”现象。解偶连蛋白 1 (Uncoupling protein 1, UCP1) 是调节动物脂肪沉积和抗寒产热的关键因子。猪天然缺乏 UCP1 基因, 棕色脂肪则没有产热性能, 导致仔猪体温调节不良, 易受寒冷的影响。2017 年, Zheng 等^[35]利用 CRISPR/Cas9 技术将外源性小鼠 UCP1 基因定点插入到猪内源性 UCP1 基因位点, 成功获得转 UCP1 基因猪。该基因编辑猪弥补了仔猪自身产热能力的不足, 降低仔猪因寒冷应激而死亡的几率; 同时还减少了猪体内脂肪沉积, 提高瘦肉率。利用 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 等基因组编辑技术制备与培育基因编辑猪, 是猪生产性状遗传育种的一大飞跃。但中国猪种资源丰富, 结合地方特色培

育将不仅有利于促进猪的生长, 提高猪的生产效益, 而且有助于在畜牧业生产上改良育种。

3.2 提高猪肉品质

随着人们生活水平的提高, 人们对猪肉的需要也从最初的满足需要向吃得香和吃得健康转变。猪体脂中所含脂肪酸分为多不饱和脂肪酸 (Poly unsaturated fatty acids, PUFAs) 和饱和脂肪酸, 其中不饱和脂肪酸是人体所需的必需脂肪酸, 具有改善心血管, 提高免疫功能等作用。由于猪体缺乏饱和脂肪酸脱氢酶, 不能自主合成不饱和脂肪酸, 因此猪肉中含有大量的饱和脂肪酸, 食用过量, 容易增加高血压、高胆固醇等疾病的风险。2004 年, Saeki 等^[36]将脂肪酸去饱和酶 (Fatty acid desaturase-2, FAD-2) 基因转入猪的基因组中, 转 FAD-2 基因猪猪肉中不饱和脂肪酸的含量高于普通猪 20%。此外, 不饱和脂肪酸包括 ω -3 和 ω -6, 其中 ω -3 在改善心血管病症中扮演着重要角色, 但由于猪体内缺乏将 ω -6 脂肪酸转化成 ω -3 脂肪酸的酶^[37-39], 导致猪肉中 ω -3 含量较低, 不能满足人类健康饮食的需求。2006 年, Lai 等^[39]在猪中过表达秀丽线虫 *Fat-1* 基因, 使猪肉中 ω -6 脂肪酸转变为 ω -3 脂肪酸, 成功培育出了富含 ω -3 脂肪酸的转基因猪。随后, Zhang 等^[40]和 Li 等^[41]通过将 *Fat-1* 基因整合至猪基因组中, 成功获得中转 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因的转基因猪, 大大提高了猪肉的营养健康价值。Tang 等^[42]利用体细胞核移植技术, 成功获得表达 2 个脂肪酸去饱和酶 *Fat-1* 和 *Fat-2* 的转基因猪, 显著提高肌肉, 脂肪等组织中 ω -3 和 ω -6 的含量, 为培育优质健康家畜新品种提供方法 (数据未发表)。此外, 影响猪肉品质的因素除脂肪中不饱和脂肪酸含量等内在因素外, 肉色、肌间脂肪含量和肌纤维类型等仍然是目前猪肉品质研究的热点。过氧化物酶体增殖受体 γ 辅激活因子 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha, PGC1 α) 是一种转录因子共激活因子, 可诱导线粒体的生物合成和细胞呼吸功能, 是调控肌纤维类型转化的主要因子之一。为改善猪肉品质性状, Zhang 等^[43]和 Ying 等^[44]通过在猪肌肉中超表达 *PGC1 α* 基因, 使转基因猪酵解型肌纤维减少, 肉色鲜红, 滴水损失显著降低, 从而提高了猪肉的口感, 有效解决了肉质和产肉量的矛盾。

3.3 提高饲料利用率

玉米、大豆和小麦等饲料原料中含有大量的非淀粉多糖, 其将饲料营养物质包埋在细胞壁夹层或内部, 同时通过阻碍消化酶与食糜的接触, 减慢营养物质向肠道的扩散速度, 影响脂肪、淀粉和蛋白

质等营养成分的吸收和利用^[45-46]。传统提高饲料利用率的方法包括根据猪生长和生理需要提供不同的营养配方和在饲料中添加酶制剂等,其中饲料中添加酶制剂在提高饲料营养消化效率的同时,有利于减少猪排泄中磷、氮排放。但酶制剂在生产应用过程中容易受各种因素的影响,如调制温度、贮存时间和酶活性等,增加饲料成本的同时达不到提高消化效率的效果。2001 年, Golovan 等^[46]利用小鼠腮腺蛋白启动子制备转植酸酶基因猪,使猪的饲料利用效率提高的同时,降低了 75% 的粪磷排放。随后,该团队对这批转基因猪长达 9 代的跟踪结果显示,植酸酶基因可以稳定遗传给下一代,同时在断奶、生长、育肥阶段可显著提高饲料磷的消化率达 20% 以上。2015 年, Lin 等^[47]通过原核注射方式获得含转纤维素酶基因猪,该猪饲料干物质和中性洗涤纤维的消化效率显著提高,这将有利于提高猪对富含纤维饲料的摄入量,提高饲料利用效率。Huang 等^[48]和 Zhang 等^[49]通过挖掘不同物种消化酶单基因在细胞表达水平的前提下,成功获得转木聚糖酶基因小鼠、转葡聚糖酶基因猪和转纤维素酶基因猪等模型动物。由于转单一消化酶基因对饲料中纤维素、木聚糖和葡萄糖等成分消化效果甚微, Zhang 等^[45]将 4 个来自微生物的酶类基因 *bg17A*、*eg1314*、*xynB* 以及 *eappA* 整合到猪胎儿成纤维细胞基因组上,利用体细胞克隆技术培育出转 4 种酶基因的新育种材料,该猪在饲养过程中氮磷排出显著减少,同时对饲料中营养物质的摄取和吸收增加了,猪只生长速度快,育肥出栏快,该研究有望缓解养猪业的环境污染和粮食消耗等问题。

3.4 提高抗病性

猪病的爆发不仅给养殖业带来了巨大的经济损失,而且人畜共患病也严重威胁人类的安全。随着越来越多的环保、抗生素残留等问题的出现,科研人员意识到,单纯依靠疫苗和药物治疗已经无法彻底防控猪病。近年来,利用转基因和基因编辑技术,科研人员在猪抗病育种中获得了较大进展。口蹄疫是由口蹄疫病毒 (Foot and mouth disease virus, FMDV) 引起的一种偶蹄动物急性、高度传播性疾病。2015 年, Hu 等^[50]成功制备了靶向 FMDV 的干扰 RNA 的转基因猪,该猪有效抑制 FMDV 病毒繁殖,不表现出感染病毒后的临床症状和病理特征;随后 Xie 等^[51]利用同样的方法,成功获得定点整合转 shRNA 的抗猪瘟转基因猪,该猪有效抵抗猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CFSV) 的感染。值得注意的是, Yan 等^[52]通过超表达抗黏液病毒基因 (Myxovirus resistance gene, *Mx1*) 也成功制

备有效抵抗 CFSV 复制的转 *Mx1* 基因猪。江戈龙等^[53]通过细胞水平上筛选出能有效抑制圆环病毒 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 的 siRNA 片段,并利用体细胞克隆技术成功培育出抗 PCV2 克隆转基因猪,经过两代的跟踪结果发现,转基因猪可有效抑制 PCV2 复制,且其余各项生长性能指标与野生型猪无显著差异。

蓝耳病全称猪繁殖与呼吸障碍综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 是一种由 PRRS 病毒引起的繁殖障碍和呼吸系统的传染病,是目前危害养猪业最严重的病毒性疫病之一。研究表明,清道夫受体 *CD163* 是 PRRSV 的主要受体基因^[54-55]。从 2013 年起, Prather 团队针对 PRRSV 的受体做了多种基因敲除猪^[56-58],发现 *CD163* 第 7 外显子双等位基因敲除猪攻毒后未表现出临床症状,具有良好的抗蓝耳病能力^[56]。该研究开创了利用基因编辑技术抵御猪病毒性传染疾病的先河,自此之后多家育种公司和科研院所开启了抗猪蓝耳病基因编辑猪育种,并成功获得了抗猪蓝耳病猪群体^[59-63]。Yang 等^[62]利用 CRISPR/Cas9 敲除 *SRCR5* 结构域的 *CD163*,成功制备 *CD163* 敲除猪。与野生型对照相比, *CD163* 基因编辑猪感染 PRRSV 后不表现高热、呼吸障碍症状等临床症状,血清指标及抗体指标均保持正常水平。除了蓝耳病外,对于伪狂犬、非洲猪瘟、口蹄疫、圆环病毒病和流行性腹泻等一系列猪病,如果可以用相同的技术手段,获得免疫病毒感染的猪育种新材料,将对家畜抗病育种的研究具有重要的推动作用。

非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起的一种急性、烈性、高度接触性的传染病,阻碍了全球养猪业的健康发展。2018 年 8 月 3 日,首例非洲猪瘟疫情在中国辽宁省沈阳市确诊,随后迅速蔓延至全国,给养猪业造成严重的经济损失。尽管研究人员在免疫佐剂、DNA 疫苗、弱毒疫苗和亚单位疫苗等方面做了大量的研究工作,但临床结果表明这些疫苗均不能提供良好的保护效率^[64]。2016 年, Lillico 等^[65]研究发现,非洲疣猪可携带非洲猪瘟病毒却不发病,而家猪在感染非洲猪瘟病毒后,死亡率高达 100%。基因组测序分析发现,家猪和非洲疣猪在 *RELA* 基因上存在 3 个 SNP 位点的遗传差异,这可能是家猪易感 ASFV 的一个重要原因。随后该团队利用 ZFN 技术将家猪 *RELA* 基因的 3 个 SNP 精确替换为非洲疣猪的 SNP,成功制备了基因编辑猪^[65],可惜该猪并没有后续报道,抗病效率还需要进一步确认。但这种通过高通量、大规模的全基因组选择和测序

分型方法,发现新型遗传标记,并结合基因编辑技术精准验证 SNP 位点,不仅改变目前全基因组选育中完全依赖算法造成的统计学误差,而且打破了常规培育具有抗病性状新品种的枷锁。

4 转基因和基因编辑猪在医学领域中的应用

随着基因编辑技术的发展,科研人员利用 ZFN、TALEN 和 CRISPR 等基因操作技术对猪基因组进行有目的的改造,获得一大批有生物反应器、人类疾病模型和异种器官移植应用前景的猪模型^[2-3, 28, 66-72],这些猪模型可以大批量地高效生产活性蛋白药物,提供异种器官用于缓解移植用器官不足等。同时这些具有特定功能或基因缺陷猪可以精确模拟人类复杂的疾病病症与病程,目前已被广泛用于心血管系统疾病、代谢性疾病、神经退行性疾病、囊性纤维化病和异种器官移植等生物医学领域,对人类疾病治疗方法的研究起到推动作用。

4.1 生物反应器

随着医疗水平的发展和人们对重组蛋白药物的接受度提高,传统生产重组蛋白的方式已无法满足人们的需求,必须寻求更高效的生产医用蛋白的策略,其中猪生物反应器生产的重组蛋白因其活性高、质量好而被广泛使用^[73-74]。转基因和基因编辑猪生物反应器是指利用猪特定组织或器官高效表达外源蛋白,以期从组织或器官中获取重组蛋白,其中乳腺、血液和唾液腺为最常用的组织器官^[75-79]。自从 1987 年报道首例乳腺生物反应器的小鼠模型^[80]以后,研究人员迅速将其应用于猪等大动物研究,其中血清白蛋白、乳铁蛋白和溶菌酶等表达已经达到商业化水平^[74]。Bleck 等^[81]成功制备在乳腺中 α -牛乳清蛋白特异性表达的转基因猪,该猪在整个泌乳期内产生的牛乳清蛋白显著高于对照组。随后, Ma 等^[77]通过乳腺中高表达重组人 α -乳清蛋白转基因猪,增强仔猪断奶前的肠道发育和日增质量的同时,成功获得活性高的人重组乳清蛋白。人血清白蛋白是血浆中含量最丰富的蛋白质,在维持血液渗透压、体液平衡和营养供给等方面具有重要功能,在临床上可以治疗失血、创伤等引起的休克或水肿等病症^[82]。Peng 等^[83]利用 CRISPR/Cas9 技术,首次将猪作为乳腺反应器动物生产人重组血清白蛋白, Li 等^[84]利用 TALEN 技术成功制备在血液中高表达人血清白蛋白的转基因猪。Zeng 等^[85]通过构建唾液腺中表达人源神经生长因子的转基因小鼠模型,证明其生物活性后运用至猪体内,成功制备了转人源神经生长因子基因

猪,目前正在分离纯化鉴定中。这些生物反应器的发展与应用极大程度上弥补了小鼠等生物反应器蛋白表达总量相对较少、活性不高等缺点,为推动重组蛋白的应用作出了重要贡献。

4.2 人类疾病模型

相对于小鼠等模式动物,猪的生理学、解剖学和遗传学特征与人类非常接近,是一种研究人类疾病的最佳动物模型。心血管疾病是当代社会引起死亡高发的重要原因之一。血管性血友病 (Von willebrand disease, vWD) 是由血管性血友病因子 (Von willebrand factor, vWF) 基因缺陷所造成的,仅次于血友病的常见遗传性出血性疾病。2014 年, Hai 等^[86]通过显微注射 Cas9mRNA 和靶向猪 vWF 基因 sgRNA 至猪胚胎,高效制备 vWF 双等位敲除基因的广西巴马小型基因编辑猪,该猪出现严重的凝血功能障碍,与血管性血友病患者的临床表现相似,这将为人类 I 型和 III 型血管性血友病的治疗提供重要的模型支撑。此外, Zhou 等^[87]利用 CRISPR/Cas9 系统,针对皮肤白化病相关的酪氨酸酶 (Tyrosinase, TYR) 基因,成功建立人类白化病猪模型,为人类研究白化病发病机制及治疗提供了重要的模型。PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ) 基因与人类心血管疾病、机体免疫及胰岛素抵抗有着密切关系。2011 年, Yang 等^[88]利用 ZFN 技术和体细胞核移植技术,成功生产出了 2 头 PPAR γ 基因敲除猪,后期研究发现该猪较好地拟合了人类心血管疾病病症,为研究 PPAR γ 在人类心血管疾病中的作用奠定了基础。低密度脂蛋白受体 (Low-density lipoprotein receptor, LDLR) 是家族性高胆固醇血症的主要致病基因,其特点是血液中胆固醇水平升高,增加动脉粥样硬化与早发冠心病的风险。Carlson 等^[89]利用 TALEN 技术构建了 LDLR 基因敲除小型猪,建立了家族性高胆固醇血症的理想试验动物模型。Wang 等^[90]利用 CRIPR/Cas9 成功制备 NPC1L1 (Niemann-pick c1-like 1) 敲除猪,为研究 NPC1L1 基因是如何影响人类对膳食和胆汁胆固醇的吸收提供新的信息。随后, Huang 等^[91]利用 CRISPR/Cas9 技术成功制备了载脂蛋白 E (Apo lipoprotein E, ApoE) 和低密度脂蛋白受体 LDLR 双基因敲除猪,该猪可表现出高甘油三酯血症和重度高胆固醇血症,为研究动脉粥样硬化疾病提供的良好医学模型。这些心血管疾病猪模型的建立,将为研究人类心血管疾病发病机理以及探索治疗新方法等提供参考,显示其巨大的市场潜力和产业化前景。

神经退行性疾病是由神经元和 (或) 其髓鞘丧

失功能导致的, 肢体功能障碍疾病, 包括肌萎缩侧索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、亨廷顿舞蹈症 (Huntington's disease, HD) 和帕金森综合征 (Parkinson's disease, PD) 等^[92]。ALS 又称渐冻人症, 是一种致命的神经退行性疾病, 目前尚未有效治疗的药物和方法。2014 年, Yang 等^[93] 针对 ALS 的致病基因 *SOD1* 进行基因编辑, 成功构建了 *SOD1* 基因突变猪, 该猪表现出渐冻患者的运动神经受损, 肌肉萎缩等典型症状。随后 Wang 等^[94] 利用转基因技术针对另一个 ALS 的致病基因 *TDP-43*, 成功构建 ALS 猪模型, 这将为 ALS 的治疗提供有力保障。帕金森综合征是另一种常见的神经退行性疾病, 其发病机制相对 ALS 更为复杂, 仅约 10% 的患者是由于某些特定基因突变导致, 如 *DJ-1*、*parkin*、*PINK1* 和 *PINK2* 等^[95-96]。2015 年, Zhou 等^[87] 利用 CRISPR/Cas9 技术同时成功构建 *PINK1* 和 *parkin* 双基因敲除猪, 随后 Zhou 等^[97] 通过敲除 *PINK1* 和 *PINK2* 双基因, 成功获得了 PD 猪模型; Wang 等^[98] 利用 CRISPR/Cas9 显微注射猪受精卵, 成功制备 *DJ-1*、*parkin* 和 *PINK1* 3 个基因缺失的猪模型; 遗憾的是这些猪模型并没有检测出 PD 的临床症状, 可能会随着猪年龄的增长, 最后表现出 PD 症状。HD 是一种由 Huntingtin(*HTT*) 基因突变引起的脑部特定神经元退化的遗传性疾病。2001 年, Uchida 等^[99] 通过显微注射受精卵的方式, 成功获得 *HTT* 突变 (75Q) 的基因编辑猪。随后, Yang 等^[100] 通过体细胞克隆技术制备了 HD 猪模型 (105Q 或 160Q), Baxa 等^[101] 通过构建 2 种不同 N-端和全长的 *HTT*(145Q) 转基因猪。虽然它们能检测出突变的 *HTT* 表达, 但行为表现和生活力上没有表现出明显的 HD 表型。2018 年, Yan 等^[2] 同样应用 CRISPR/Cas9 技术将人源的突变 *HTT* 基因定点插入到猪 *HTT* 基因座内, 建立了表达人源性全长突变型 *HTT* 的基因编辑猪, 该猪模型精准地模拟出人类神经退行性疾病的特征, 如运动、行为异常以及早死症状、大脑出现纹状体神经元退化等, 这可以用于研究大型哺乳动物神经性疾病的发病机制及其治疗方案。

作为研究人类疾病的理想模型, 猪不仅在研究心血管疾病, 神经退行性疾病方面作出卓越贡献, 在其他疾病如囊肿性纤维化 (Cystic fibrosis, CF)、杜氏肌肉萎缩症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD)、癌症等方面也有着其他动物不可比拟的作用。2008 年, Rogers 等^[102-103] 利用 AAV 介导的同源重组技术成功构建了囊肿性纤维化致病因子

CFTR 突变的猪模型。小猪出生后 24~48 h 出现明显的胎粪梗阻, 同时其他器官如胰脏、肝脏等均表现出与人类患者相似的特征, 为研究与治疗 CF 提供了新的平台。2013 年, Klymiuk 等^[104] 通过敲除抗肌萎缩蛋白 (Dystrophin) 基因, 获得运动能力下降、肌肉萎缩和呼吸衰竭等病症的 DMD 猪模型, 可惜这些猪出生一周后几乎都死亡, 没有一头猪可以活到配种阶段。随后多个研究平台相继建立了 DMD 猪模型, 如 Yu 等^[105] 通过 CRISPR-Cas9 技术敲除滇南小型猪受精卵 *DMD* 基因, 成功地构建出人类 DMD 疾病模型; 另外, 利用大动物猪还构建了其他人类疾病模型, 如结肠癌^[106-107]、人甲减贫血和免疫缺陷^[108]、胃癌^[109]、神经性耳聋^[110]、色素性视网膜炎^[111] 和多囊性肾病^[112] 等; 这些疾病模型的建立将为人类疾病和家畜疫病的发病机理提供重要的模型支持, 对疾病治疗方法的研究起到推动作用。

4.3 异种器官移植

异种器官移植和异种细胞移植是解决人供体器官短缺的重要途径, 而猪则被认为是人体异种器官来源以及异种细胞再生的首选动物, 其器官不但体积和组织结构上和人类器官非常相似, 而且可避免灵长类动物作为异种供体源的伦理问题。尽管猪可能可以作为人体器官移植的供体, 但直接将正常的猪器官移植至病人体内, 会出现一系列的免疫排斥反应, 如超急性排斥反应、急性血管性排斥反应和慢性排斥反应等。同时, 猪内源性逆转录病毒 (Porcine endogenous retroviruses, PERVs) 对病人也具有潜在风险。因此如何避免免疫排斥反应和 PERV 的跨物种感染是实现猪的器官异种移植首要攻克的两难难题。

免疫排斥反应是机体对移植物 (异体细胞、组织或器官) 通过特异性免疫应答使其破坏的过程, 其中受体体内预存的天然异种抗体 (Xenoreactive natural antibodies, XNAs) 识别异种抗原 Gal 表位是产生免疫排斥的主要因素^[113]。2002 年, 赖良学首次报道通过同源重组方法敲除猪 α -1,3-半乳糖转移酶基因 (α -1,3-galactosyltransferase, *GGTA1*), 阻断 Gal 表位的生成, 有效克服异种器官移植的超急性排斥反应^[114]。随后, 多个团队先后利用基因编辑技术成功获得 *GGTA1* 以及与免疫相关基因敲除的猪模型。2003 年, Dai 等^[115] 通过同源重组技术破坏猪 α -1,3-半乳糖基转移酶基因, 成功制备了 *GGTA1* 基因缺陷猪模型; 2011 年, Hauschild 等^[116] 利用 ZFN 制备了 *GGTA1* 的敲除猪; 2013 年, Xin 等^[117] 利用 TALEN 技术再次对猪 *GGTA1* 基因进行敲除, 得到双等位基因敲除猪; 2016 年, Kang 等^[118]

利用 TALEN 技术对猪的 *GGTA1* 基因进行敲除; 2017 年, Chuang 等^[119] 利用 CRISPR/Cas9 原核显微猪胚胎细胞, 生产出 *GGTA1* 基因缺失的猪。除 Gal 表位免疫抗原外, 单磷酸胞嘧啶-N-乙酰神经氨酸羟化酶 (Cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, *CMAH*) 基因编码的 β -1,4-N 乙酰半乳糖氨基转移酶 2(β -1,4-N-acetylglactosaminyl transferase 2, *b4GALNT2*) 和 N-羟乙酰神经氨酸 (N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc) 是另外 2 种主要免疫抗原。2013 年, Lutz 等^[120] 利用 ZFN 基因编辑技术, 成功获得 *GGTA1/CMAH* 双基因敲除猪模型, 并在体外证明了 *GGTA1/CMAH* 双基因敲除猪的免疫排斥反应相对单基因 *GGTA1* 敲除猪更小, 更有利于实现异种器官移植。2014 年, Li 等^[121] 针对 3 个与免疫排斥相关的基因 *GGTA1*、*CMAH* 和异红细胞糖苷酯合成酶 (*iGb3S*) 基因, 利用 CRISPR/Cas9 技术获得了单个基因或同时敲除 2 个或 3 个基因猪模型, 随后 Estrada 等^[71] 利用相同技术分别获得 *GGTA1*、*GGTA1/CMAH* 和 *GGTA1/CMAH/ β 4GalNT2* 基因敲除猪, 通过对比 3 种基因敲除猪, 发现 *β 4GalNT2* 基因敲除猪细胞与人源 IgM 和 IgG 抗体的结合能力明显下降, 表明该模型可有效降低异种移植中的抗原性。这些特异性抗原敲除猪模型的建立, 将为扫除猪器官用于人体移植的安全障碍, 推动猪器官的临床应用奠定基础。

PERV 是指整合在猪基因组的病毒, 一般在猪体内不会有毒性。当猪的细胞和人的细胞接触时, 内源性逆转录病毒会从猪的基因组“跳”到人的基因组, 导致 PERV 的跨物种感染^[122-123]。敲除猪基因组 *PERV* 序列可为避免 PERV 种间传播, 异种移植转向临床应用的医疗风险和生物安全问题提供解决措施。2015 年, Yang 等^[124] 利用 CRISPR/Cas9 技术全基因组范围内敲除猪肾细胞系中所有 62 个拷贝的 *PERV* 基因, 使人感染 PERV 的风险下降至以前的 1/1 000; 随后 Niu 等^[125] 成功获得世界首批内源性逆转录病毒灭活猪猪模型, 为实现猪器官的异种移植提供了关键技术。综上所述, 转基因或基因编辑猪的研究为异种器官移植的供体提供了巨大的可能性, 同时为打破人类器官移植资源匮乏的现状带来了曙光。

5 总结

目前, 科研人员已经成功制备出一系列特定功能的转基因或基因编辑猪模型, 随着技术的不断发展与成熟, 未来将更加广泛地应用到种质资源新品

种创建、建立人类疾病模型、纠正缺陷性致病基因和消除病毒/细菌感染等农业或医学领域。但是, 转基因或基因编辑猪的产业化推广和应用仍有诸多问题需要克服。首先, 利用体细胞克隆技术生产转基因或基因编辑猪效率依然很低, 仅有 1%~2% 左右, 远低于体内受精胚胎在母猪子宫内的发育效率。虽然研究人员通过优化供体细胞的选择、减少供体细胞的传代次数、矫正克隆胚胎基因组异常表观遗传修饰状态等方式来提高克隆的效率, 但对猪体细胞克隆效率提高幅度也非常有限, 提高后的效率仍然不超过 2%。低下的猪体细胞克隆效率使得基因编辑技术的应用成本大幅增加, 迫切需要探索更为有效的方法来提高克隆猪的生产效率。其次, CRISPR/Cas9 等基因编辑技术虽然能高效产生基因组靶点 DNA 双链断裂, 但以同源定向修复介导的定点突变和敲入效率仍然十分低下; 同时该技术还存在明显的脱靶效应, 导致转基因或基因编辑猪在器官移植等应用方面存在安全风险; 因此如何降低基因编辑技术的脱靶效应、寻找提高基因组定点修饰效率的方法和降低制备转基因或基因编辑猪模型的成本等问题仍需深入探讨。再者, 随着高通量测序、全基因组水平关联分析和功能基因研究等相关研究的发展和应用, 越来越多的猪功能候选基因和人类疾病候选致病因子被相继发现, 如何利用基因编辑技术探索猪基因组功能、实现生产性状的遗传改良和克服物种差异、准确模拟人类疾病仍需要深入研究。最后, 从中山大学黄军就首次对不能发育的人类胚胎基因组进行编辑事件到原南方科技大学副教授贺建奎的“基因编辑婴儿”事件, 都在提醒和要求相关监管部门规范和加紧制定转基因或基因编辑猪检测和研究的相關标准, 严格限制其应用的范围, 杜绝违规滥用现象。相信随着基因编辑技术的完善, 猪遗传改良育种、人类疾病研究和药物开发将迎来全新的机遇与挑战。

参考文献:

[1] WANG J, LIU M, ZHAO L, et al. Disabling of nephrogenesis in porcine embryos via CRISPR/Cas9-mediated *SIX1* and *SIX4* gene targeting[J]. *Xenotransplantation*, 2019, 26(3): e12484.

[2] YAN S, TU Z, LIU Z, et al. A Huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease[J]. *Cell*, 2018, 173(4): 989-1002.

[3] HAI T, GUO W, YAO J, et al. Creation of miniature pig model of human Waardenburg syndrome type 2A by ENU mutagenesis[J]. *Hum Genet*, 2017, 136(11/12): 1463-1475.

[4] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and

- applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278.
- [5] NISHIMASU H, RAN F A, HSU P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA[J]. *Cell*, 2014, 156(5): 935-949.
 - [6] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
 - [7] RAN F A, HSU P D, LIN C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1380-1389.
 - [8] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
 - [9] 吴添文, 齐传翔, 李训碧, 等. 基因组编辑猪的研究现状及展望[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(5): 781-787.
 - [10] ZHANG H X, ZHANG Y, YIN H. Genome editing with mRNA encoding ZFN, TALEN, and Cas9[J]. *Mol Ther*, 2019, 27(4): 735-746.
 - [11] TOWNSEND J A, WRIGHT D A, WINFREY R J, et al. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases[J]. *Nature*, 2009, 459(7245): 442-445.
 - [12] LOMBARDO A, GENOVESE P, BEAUSEJOUR C M, et al. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1298-1306.
 - [13] DURAI S, MANI M, KANDAVELOU K, et al. Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(18): 5978-5990.
 - [14] CHU C, YANG Z, YANG J, et al. Homologous recombination-mediated targeted integration in monkey embryos using TALE nucleases[J]. *BMC Biotechnol*, 2019, 19: 7.
 - [15] GUILINGER J P, PATTANAYAK V, REYON D, et al. Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity[J]. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 429-435.
 - [16] CERMAK T, DOYLE E L, CHRISTIAN M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): e82.
 - [17] LI T, HUANG S, ZHAO X, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(14): 6315-6325.
 - [18] HIRANO S, NISHIMASU H, ISHITANI R, et al. Structural basis for the altered PAM specificities of engineered CRISPR-Cas9[J]. *Mol Cell*, 2016, 61(6): 886-894.
 - [19] HU J H, MILLER S M, GEURTS M H, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity[J]. *Nature*, 2018, 556(7699): 57-63.
 - [20] XU S, CAO S, ZOU B, et al. An alternative novel tool for DNA editing without target sequence limitation: The structure-guided nuclease[J]. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 186.
 - [21] SWARTS D C, VAN DER OOST J, JINEK M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a[J]. *Mol Cell*, 2017, 66(2): 221-233.
 - [22] KIM E, KOO T, PARK S W, et al. *In vivo* genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14500.
 - [23] RAN F A, CONG L, YAN W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9[J]. *Nature*, 2015, 520(7546): 186-191.
 - [24] HARRINGTON L B, BURSTEIN D, CHEN J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. *Science*, 2018, 362(6416): 839-842.
 - [25] CRUZ-GARCIA A, LOPEZ-SAAVEDRA A, HUERTAS P. *BRCA1* accelerates *CtIP*-mediated DNA-end resection[J]. *Cell Rep*, 2014, 9(2): 451-459.
 - [26] HEYER W D, EHMSSEN K T, LIU J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes[J]. *Annu Rev Genet*, 2010, 44: 113-139.
 - [27] CHEN Y, ZHENG Y, KANG Y, et al. Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9[J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(13): 3764-3774.
 - [28] YANG H, WU Z. Genome editing of pigs for agriculture and biomedicine[J]. *Front Genet*, 2018, 9: 360.
 - [29] PIERZCHALA M, PAREEK C S, URBANSKI P, et al. Study of the differential transcription in liver of growth hormone receptor (*GHR*), insulin-like growth factors (*IGF1*, *IGF2*) and insulin-like growth factor receptor (*IGF1R*) genes at different postnatal developmental ages in pig breeds[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(3): 3055-3066.
 - [30] JEON J T, CARLBORG O, TORNSTEN A, et al. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the *IGF2* locus[J]. *Nat Genet*, 1999, 21(2): 157-158.
 - [31] XIANG G, REN J, HAI T, et al. Editing porcine *IGF2* regulatory element improved meat production in Chinese Bama pigs[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(24): 4619-4628.
 - [32] LIU X, LIU H, WANG M, et al. Disruption of the *ZBED6* binding site in intron 3 of *IGF2* by CRISPR/Cas9 leads to enhanced muscle development in Liang Guang Small Spotted pigs[J]. *Transgenic Res*, 2019, 28(1): 141-150.
 - [33] QIAN L, TANG M, YANG J, et al. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscling phenotype in Meishan pigs[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14435.
 - [34] WANG K, OUYANG H, XIE Z, et al. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16623.
 - [35] ZHENG Q, LIN J, HUANG J, et al. Reconstitution of *UCPI* using CRISPR/Cas9 in the white adipose tissue of pigs decreases fat deposition and improves thermogenic capacity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(45): E9474-E9482.
 - [36] SAEKI K, MATSUMOTO K, KINOSHITA M, et al. Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase

- gene from spinach in transgenic pigs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(17): 6361-6366.
- [37] JIANG W, OKEN H, FIUZAT M, et al. Plasma omega-3 polyunsaturated fatty acids and survival in patients with chronic heart failure and major depressive disorder[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2012, 5(1): 92-99.
- [38] KANG J X. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio in chronic diseases: Animal models and molecular aspects[J]. *World Rev Nutr Diet*, 2011, 102: 22-29.
- [39] LAI L, KANG J X, LI R, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(4): 435-436.
- [40] ZHANG P, ZHANG Y, DOU H, et al. Handmade cloned transgenic piglets expressing the nematode fat-1 gene[J]. *Cell Reprogram*, 2012, 14(3): 258-266.
- [41] LI M, OUYANG H, YUAN H, et al. Site-specific fat-1 knock-in enables significant decrease of n-6PUFAs/n-3PUFAs ratio in pigs[J]. *G3-Genes Genom Genet*, 2018, 8(5): 1747-1754.
- [42] TANG F, YANG X, LIU D, et al. Co-expression of *fat1* and *fat2* in transgenic pigs promotes synthesis of polyunsaturated fatty acids[J/OL]. *Transgenic Res*, 2019. <http://doi.org/10.1007/s11248-019-00127-4>
- [43] ZHANG L, ZHOU Y, WU W, et al. Skeletal muscle-specific overexpression of *PGC-1 α* induces fiber-type conversion through enhanced mitochondrial respiration and fatty acid oxidation in mice and pigs[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(9): 1152-1162.
- [44] YING F, ZHANG L, BU G, et al. Muscle fiber-type conversion in the transgenic pigs with overexpression of *PGC1 α* gene in muscle[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(4): 669-674.
- [45] ZHANG X, LI Z, YANG H, et al. Novel transgenic pigs with enhanced growth and reduced environmental impact[J]. *Elife*, 2018, 7: e34286.
- [46] GOLOVAN S P, MEIDINGER R G, AJAKAIYE A, et al. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(8): 741-745.
- [47] LIN Y S, YANG C C, HSU C C, et al. Establishment of a novel, eco-friendly transgenic pig model using porcine pancreatic amylase promoter-driven fungal cellulase transgenes[J]. *Transgenic Res*, 2015, 24(1): 61-71.
- [48] HUANG M, LI Z, HUANG X, et al. Co-expression of two fibrolytic enzyme genes in CHO cells and transgenic mice[J]. *Transgenic Res*, 2013, 22(4): 779-790.
- [49] ZHANG M, CAI G, ZHENG E, et al. Transgenic pigs expressing beta-xylanase in the parotid gland improve nutrient utilization[J]. *Transgenic Res*, 2019, 28(2): 189-198.
- [50] HU S, QIAO J, FU Q, et al. Transgenic shRNA pigs reduce susceptibility to foot and mouth disease virus infection[J]. *Elife*, 2015, 4: e6951.
- [51] XIE Z, PANG D, YUAN H, et al. Genetically modified pigs are protected from classical swine fever virus[J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(12): e1007193.
- [52] YAN Q, YANG H, YANG D, et al. Production of transgenic pigs over-expressing the antiviral gene *Mx1*[J]. *Cell Regen (Lond)*, 2014, 3(1): 11.
- [53] 江戈龙, 高文超, 刘德武, 等. 母源抗体对感染 PCV2 仔猪体内病毒变化和免疫反应的影响[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(3): 398-403.
- [54] NIU P, SHABIR N, KHATUN A, et al. Effect of polymorphisms in the *GBPI*, *Mx1* and *CD163* genes on host responses to PRRSV infection in pigs[J]. *Vet Microbiol*, 2016, 182: 187-195.
- [55] ZHU L, SONG H, ZHANG X, et al. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection by recombinant adenovirus- and/or exosome-delivered the artificial microRNAs targeting sialoadhesin and *CD163* receptors[J]. *Virol J*, 2014, 11: 225.
- [56] WHITWORTH K M, ROWLAND R R, EWEN C L, et al. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(1): 20-22.
- [57] PRATHER R S, ROWLAND R R, EWEN C, et al. An intact sialoadhesin (*Sn/SIGLEC1/CD169*) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *J Virol*, 2013, 87(17): 9538-9546.
- [58] WHITWORTH K M, LEE K, BENNE J A, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos[J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(3): 78.
- [59] BURKARD C, LILLICO S G, REID E, et al. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking *CD163SRCR5* domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function[J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(2): e1006206.
- [60] BURKARD C, OPRIESSNIG T, MILEHAM A J, et al. Pigs lacking the scavenger receptor cysteine-rich domain 5 of *CD163* are resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection[J]. *J Virol*, 2018, 92(16): e00415-18.
- [61] CHEN J, WANG H, BAI J, et al. Generation of pigs resistant to highly pathogenic-porcine reproductive and respiratory syndrome virus through gene editing of *CD163*[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(2): 481-492.
- [62] YANG H, ZHANG J, ZHANG X, et al. *CD163* knock-out pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Antiviral Res*, 2018, 151: 63-70.
- [63] WELLS K D, BARDOT R, WHITWORTH K M, et al. Replacement of porcine *CD163* scavenger receptor cysteine-rich domain 5 with a *CD163*-like homolog confers resistance of pigs to genotype 1 but not genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *J Virol*, 2017, 91(2): e01521-16.
- [64] KARALYAN Z, ZAKARYAN H, ARAKELOVA E, et al. Evidence of hemolysis in pigs infected with highly virulent African swine fever virus[J]. *Vet World*, 2016, 9(12): 1413-1419.
- [65] LILLICO S G, PROUDFOOT C, KING T J, et al. Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21645.
- [66] PAN D, LIU T, LEI T, et al. Progress in multiple genet-

ically modified minipigs for xenotransplantation in China[J]. *Xenotransplantation*, 2019, 26(1): e12492.

[67] WANG Y, LEI T, WEI L, et al. Xenotransplantation in China: Present status[J]. *Xenotransplantation*, 2019, 26(1): e12490.

[68] 高孟雨, 杨光, 包骥. 利用 CRISPR/Cas9 技术繁育基因修饰猪在医学领域的研究进展[J]. *生物医学工程学杂志*, 2018, 35(4): 637-642.

[69] 黄耀强, 李国玲, 杨化强, 等. 基因编辑猪在生物医学研究中的应用[J]. *遗传*, 2018, 40(8): 632-646.

[70] BUTLER J R, WANG Z Y, MARTENS G R, et al. Modified glycan models of pig-to-human xenotransplantation do not enhance the human-anti-pig T cell response[J]. *Transpl Immunol*, 2016, 35: 47-51.

[71] ESTRADA J L, MARTENS G, LI P, et al. Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking *GGTA1/CMAH/beta4GalNT2* genes[J]. *Xenotransplantation*, 2015, 22(3): 194-202.

[72] 杨化强, 赖良学. 基因修饰猪作为人类疾病模型的研究进展[J]. *科技导报*, 2011, 29(30): 57-62.

[73] 曾芳, 李紫聪, 董锐, 等. 转基因猪技术及其在农业上的应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(2): 218-224.

[74] 廖莎, 李国玲, 吴珍芳, 等. 转基因动植物生物反应器研究进展及应用现状[J]. *广东农业科学*, 2018, 45(11): 126-136.

[75] LEE M H, LIN Y S, TU C F, et al. Recombinant human factor IX produced from transgenic porcine milk[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 315375.

[76] LU D, LIU S, SHANG S, et al. Production of transgenic-cloned pigs expressing large quantities of recombinant human lysozyme in milk[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e123551.

[77] MA J, LI Q, LI Y, et al. Expression of recombinant human alpha-lactalbumin in milk of transgenic cloned pigs is sufficient to enhance intestinal growth and weight gain of suckling piglets[J]. *Gene*, 2016, 584(1): 7-16.

[78] PARK J K, LEE Y K, LEE P, et al. Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs[J]. *J Biotechnol*, 2006, 122(3): 362-371.

[79] TONG J, WEI H, LIU X, et al. Production of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic pigs[J]. *Transgenic Res*, 2011, 20(2): 417-419.

[80] GORDON K, LEE E, VITALE J A, et al. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk[J]. *Biotechnology*, 1992, 24: 425-428.

[81] BLECK G T, WHITE B R, MILLER D J, et al. Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs[J]. *J Anim Sci*, 1998, 76(12): 3072-3078.

[82] FANALI G, DI MASI A, TREZZA V, et al. Human serum albumin: From bench to bedside[J]. *Mol Aspects Med*, 2012, 33(3): 209-290.

[83] PENG J, WANG Y, JIANG J, et al. Production of human albumin in pigs through CRISPR/Cas9-mediated knockin of human cDNA into swine albumin locus in the zygotes[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16705.

[84] LI L, MENG H, ZOU Q, et al. Establishment of gene-edited pigs expressing human blood-coagulation factor VII and albumin for bioartificial liver use[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2019.

[85] ZENG F, LI Z, ZHU Q, et al. Production of functional human nerve growth factor from the saliva of transgenic mice by using salivary glands as bioreactors[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41270.

[86] HAI T, TENG F, GUO R, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system[J]. *Cell Res*, 2014, 24(3): 372-375.

[87] ZHOU X, XIN J, FAN N, et al. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(6): 1175-1184.

[88] YANG D, YANG H, LI W, et al. Generation of *PPAR* gamma mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning[J]. *Cell Res*, 2011, 21(6): 979-982.

[89] CARLSON D F, FAHRENKRUG S C, HACKETT P B. Targeting DNA with fingers and TALENs[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2012, 1: e3.

[90] WANG Y, DU Y, SHEN B, et al. Efficient generation of gene-modified pigs via injection of zygote with Cas9/sgRNA[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8256.

[91] HUANG L, HUA Z, XIAO H, et al. CRISPR/Cas9-mediated *ApoE*^{-/-} and *LDLR*^{-/-} double gene knockout in pigs elevates serum LDL-C and TC levels[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37751-37760.

[92] HOLM I E, ALSTRUP A K, LUO Y. Genetically modified pig models for neurodegenerative disorders[J]. *J Pathol*, 2016, 238(2): 267-287.

[93] YANG H, WANG G, SUN H, et al. Species-dependent neuropathology in transgenic *SOD1* pigs[J]. *Cell Res*, 2014, 24(4): 464-481.

[94] WANG G, YANG H, YAN S, et al. Cytoplasmic mislocalization of RNA splicing factors and aberrant neuronal gene splicing in TDP-43 transgenic pig brain[J]. *Mol Neurodegener*, 2015, 10: 42.

[95] UCHIHARA Y, KATAOKA H, YOSHINO H, et al. *Parkin* mutation may be associated with serious akinesia in a patient with Parkinson's disease[J]. *J Neurol Sci*, 2017, 379: 119-121.

[96] VALENTE E M, SALVI S, IALONGO T, et al. *PINK1* mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism[J]. *Ann Neurol*, 2004, 56(3): 336-341.

[97] ZHOU X, WANG L, DU Y, et al. Efficient generation of gene-modified pigs harboring precise orthologous human mutation via CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair in zygotes[J]. *Hum Mutat*, 2016, 37(1): 110-118.

[98] WANG X, CAO C, HUANG J, et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20620.

[99] UCHIDA M, SHIMATSU Y, ONOE K, et al. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection[J]. *Transgenic Res*, 2001, 10(6): 577-582.

[100] YANG D, WANG C E, ZHAO B, et al. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(20): 3983-3994.

- [101] BAXA M, HRUSKA-PLOCHAN M, JUHAS S, et al. A transgenic minipig model of Huntington's disease[J]. *J Huntingtons Dis*, 2013, 2(1): 47-68.
- [102] ROGERS C S, HAO Y, ROKHLINA T, et al. Production of *CFTR*-null and *CFTR*-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(4): 1571-1577.
- [103] ROGERS C S, STOLTZ D A, MEYERHOLZ D K, et al. Disruption of the *CFTR* gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs[J]. *Science*, 2008, 321(5897): 1837-1841.
- [104] KLYMIUK N, BLUTKE A, GRAF A, et al. Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(21): 4368-4382.
- [105] YU H H, ZHAO H, QING Y B, et al. Porcine zygote injection with Cas9/sgrRNA results in DMD-modified pig with muscle dystrophy[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10).
- [106] FLISIKOWSKA T, MERKL C, LANDMANN M, et al. A porcine model of familial adenomatous polyposis[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(5): 1173-1175.
- [107] SIKORSKA A, FLISIKOWSKA T, STACHOWIAK M, et al. Elevated expression of *p53* in early colon polyps in a pig model of human familial adenomatous polyposis[J]. *J Appl Genet*, 2018, 59(4): 485-491.
- [108] ZHANG Y, XUE Y, CAO C, et al. Thyroid hormone regulates hematopoiesis via the TR-KLF9 axis[J]. *Blood*, 2017, 130(20): 2161-2170.
- [109] KANG J T, RYU J, CHO B, et al. Generation of *RUNX3* knockout pigs using CRISPR/Cas9-mediated gene targeting[J]. *Reprod Domest Anim*, 2016, 51(6): 970-978.
- [110] GAO X, TAO Y, LAMAS V, et al. Treatment of autosomal dominant hearing loss by *in vivo* delivery of genome editing agents[J]. *Nature*, 2018, 553(7687): 217-221.
- [111] ROSS J W, FERNANDEZ D C J, ZHAO J, et al. Generation of an inbred miniature pig model of retinitis pigmentosa[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(1): 501-507.
- [112] HE J, LI Q, FANG S, et al. *PKDI* mono-allelic knockout is sufficient to trigger renal cystogenesis in a minipig model[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(4): 361-369.
- [113] COOPER D K, SATYANANDA V, EKSER B, et al. Progress in pig-to-non-human primate transplantation models (1998-2013): A comprehensive review of the literature[J]. *Xenotransplantation*, 2014, 21(5): 397-419.
- [114] LAI L, KOLBER-SIMONDS D, PARK K W, et al. Production of α -1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning[J]. *Science*, 2002, 295(5557): 1089-1092.
- [115] DAI Y, VAUGHT T D, BOONE J, et al. Targeted disruption of the α 1, 3-galactosyltransferase gene in cloned pigs[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(3): 251-255.
- [116] HAUSCHILD J, PETERSEN B, SANTIAGO Y, et al. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(29): 12013-12017.
- [117] XIN J, YANG H, FAN N, et al. Highly efficient generation of *GGTA1* biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84250.
- [118] KANG J T, KWON D K, PARK A R, et al. Production of α 1, 3-galactosyltransferase targeted pigs using transcription activator-like effector nuclease-mediated genome editing technology[J]. *J Vet Sci*, 2016, 17(1): 89-96.
- [119] CHUANG C K, CHEN C H, HUANG C L, et al. Generation of *GGTA1* mutant pigs by direct pronuclear microinjection of CRISPR/Cas9 plasmid vectors[J]. *Anim Biotechnol*, 2017, 28(3): 174-181.
- [120] LUTZ A J, LI P, ESTRADA J L, et al. Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and galactose α -1, 3-galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation[J]. *Xenotransplantation*, 2013, 20(1): 27-35.
- [121] LI P, ESTRADA J L, BURLAK C, et al. Efficient generation of genetically distinct pigs in a single pregnancy using multiplexed single-guide RNA and carbohydrate selection[J]. *Xenotransplantation*, 2015, 22(1): 20-31.
- [122] DENNER J. Why was PERV not transmitted during preclinical and clinical xenotransplantation trials and after inoculation of animals?[J]. *Retrovirology*, 2018, 15(1): 28.
- [123] 李锐开, 龙科任, 麦苗苗, 等. CRISPR-Cas9 技术的原理及其在猪研究中的应用[J]. *生命科学*, 2018, 30(6): 690-700.
- [124] YANG L, GUELL M, NIU D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs)[J]. *Science*, 2015, 350(6264): 1101-1104.
- [125] NIU D, WEI H J, LIN L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2017, 357(6357): 1303-1307.

【责任编辑 庄 延】



吴珍芳, 博士, 华南农业大学二级教授, 博士生导师, 国家生猪种业工程技术研究中心主任, 兼温氏食品集团研究院院长。中国畜牧兽医学会养猪分会副理事长, 广东省现代农业产业体系生猪创新团队首席专家, 国家科技重大专项和国家重点研发计划总体组专家, 广东省“珠江学者”岗位特聘教授, 国家“万人计划”科技创新领军人才, 国务院特殊津贴专家。被授予“南粤优秀教师”称号和广东省“五一”劳动奖章。主要从事猪的遗传育种与产业化应用研究, 先后主持国家转基因新品种培育重大科技计划、“863”计划重点课题等29项。以第一完成人获得国家科技进步奖二等奖1项, 中国产学研合作科技创新一等奖1项, 全国农牧渔业丰收奖农业技术推广合作奖1项, 广东省科学技术奖一等奖2项, 大北农科技奖一等奖1项和广东省农业技术推广一等奖3项。